



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL  
CEMENTO EN TEJIDOS DENTALES.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A :

**YAZMÍN MARTÍNEZ CARRILLO**

**DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ  
DIRECTOR DE TESIS.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A mis padres: Paty Carrillo y Humberto Martínez**

**Mi familia: Chuy y los Olivier**

**y a mi madrina Lidia Violeta.**

**G R A C I A S.**

# **INDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>1</b>
<b>PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>7</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>8</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>10</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>13</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>14</b>
<b>ANEXO (Figuras)</b>	<b>18</b>

## **INTRODUCCIÓN.**

El cemento es un tejido importante en el periodonto ya que permite la inserción de las fibras de colágena del ligamento periodontal, dando soporte al órgano dentario. El proceso de formación de este tejido, la producción de proteínas de matriz extracelular por parte de los cementoblastos y la forma como responden dichas células aún son interrogantes que permanecen como preguntas abiertas en el campo de la biología periodontal.

Es claro entonces, que el cemento radicular es un tejido que nos interesa porque existen muchos mecanismos sin explicación hasta el momento, donde el estudio de la expresión y la producción de proteínas específicas del cemento radicular pueden ayudar a entender cómo es la formación, la reorganización de la matriz extracelular, la reorganización de las fibras de colágena y posiblemente el reclutamiento de subpoblaciones celulares que ayuden a la formación de nuevo cemento radicular y de ligamento periodontal.

## **ANTECEDENTES.**

El cemento radicular fue descrito por primera vez en 1835 por los discípulos de Purkinje como un tejido mineralizado que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios. Sus principales funciones son proveer el anclaje para las fibras de colágena del ligamento periodontal (fibras de Sharpey), mediar la inserción del diente al hueso alveolar, distribuir las fuerzas masticatorias, jugar un papel primordial en la reparación de la superficie radicular y es de suma importancia para la formación de tejidos periodontales durante los movimientos de ortodoncia debido a que es el soporte del diente y dicta el espacio del ligamento periodontal en el alveolo<sup>1,2</sup>.

## **Estructura.**

Con el microscopio óptico pueden diferenciarse dos tipos de cemento: acelular y celular. El término cemento acelular no es muy apropiado ya que como tejido vivo, las células son parte integral del cemento en todo momento. No obstante, algunas capas de cemento radicular no incorporan células en su matriz mineralizada, característica que le da su nombre. El cemento acelular cubre la dentina radicular desde la unión cemento-esmalte hasta el ápice, pero a menudo falta en el tercio apical de la raíz. En esta porción es donde el cemento es en su totalidad de tipo celular debido a que se pueden visualizar a los cementoblastos (unidades estructurales) encargados de sintetizar la matriz tanto orgánica como inorgánica del cemento. Con microscopía electrónica, los cementoblastos se pueden observar como células cuboidales que presentan características ultraestructurales únicas: numerosas mitocondrias, un aparato de Golgi bien desarrollado y grandes cantidades de retículo endoplásmico granular, lo que revela su intensa actividad biológica.

El término de cemento celular es debido a que los cementoblastos quedan incorporados en su matriz mineralizada habiendo finalizado su función en la formación del tejido o cementogénesis, recibiendo el término de cementocito. Un cementocito típico posee numerosas prolongaciones celulares o canículos que se irradian a partir de su cuerpo celular. Estas prolongaciones pueden ramificarse y con frecuencia establecer anastomosis con las de una célula vecina. El citoplasma del cementocito contiene escasas mitocondrias, el retículo endoplásmico parece dilatado y el núcleo es pequeño revelando involución y picnosis, indicando que los cementocitos son células en proceso de degeneración y se propone que presentan una escasa actividad biológica<sup>3, 4</sup>.

## Propiedades Fisicoquímicas.

Se asume que el cemento radicular es similar al hueso, porque presenta las características siguientes:

1) Las enfermedades que afectan las propiedades del hueso, a menudo alteran las propiedades del cemento. Por ejemplo, la enfermedad de Paget resulta en hipercementosis; la hipofosfatasa resulta en la no-formación de cemento, con la exfoliación dentaria y el hipopituitarismo está asociado con la disminución de cemento<sup>5</sup>.

2) La composición inorgánica del cemento radicular es similar a la del hueso alveolar. Tanto el cemento como el hueso se componen aproximadamente del 50% de fosfatos de calcio que se encuentran en forma de cristales de hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]; con elementos trazas como magnesio (0.5 al 0.9%), flúor, sodio, cobre, azufre y zinc, sin embargo su distribución y significado no han sido estudiados a detalle<sup>2</sup>.

3) La matriz orgánica de cemento es considerada similar a la de hueso ya que consiste primariamente de colágenas Tipo I (95%) y Tipo III (5%), las cuales en conjunto desempeñan un papel de tipo estructural. Moléculas como fibronectina (FN), sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina (OC), osteonectina (SPARC) y diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF-II), factor de crecimiento fibroblástico ácido (FGFa), factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento tumoral beta ( $\text{TGF}\beta$ ), son también componentes de la matriz extracelular del cemento pero no son cemento específicas<sup>6-10</sup>.

A pesar de estas similitudes, el cemento radicular tiene características únicas que lo pueden diferenciar de hueso: presenta un color amarillo, una baja microdureza, falta de vascularización e inervación; además de poseer un bajo recambio metabólico, no presenta drenaje linfático y hasta el momento se han descrito sólo dos moléculas específicas de la matriz extracelular del cemento

radicular: la proteína de adhesión de cemento (CAP) y el factor de crecimiento de cemento (CGF)<sup>11,12</sup>.

### **Proteína de Adhesión del Cemento.**

La CAP se logró purificar y caracterizar parcialmente a partir de extractos de cemento radicular, lo cual indica que es una proteína que se secreta tanto en la matriz de cemento como en el espacio del ligamento periodontal. La CAP fue caracterizada en un estudio de Wu<sup>13</sup>, donde se describió como una proteína tipo colágena de 56 kDa; en la que seis secuencias de péptidos obtenidos, no se encuentran en otras proteínas de adhesión descritas en cemento como BSP, OPN, FN. Parte de su secuencia contiene repeticiones con los tripletes típicos de colágena Gly-X-Y; tiene homología del 82% con un dominio de colágena tipo XII y un 95% con la colágena tipo I alfa bovina. Sin embargo, los anticuerpos para colágena tipo I, V, VII y XIV no reconocen a esta proteína del cemento radicular<sup>14-16</sup>.

Estudios enfocados a entender la función de la CAP han demostrado que esta proteína promueve la adhesión de células derivadas del periodonto; tiene una alta afinidad por fibronectina, por hidroxapatita, por la dentina y por el cemento radicular<sup>17</sup>. Asimismo, se ha determinado *in vitro* que poblaciones celulares del ligamento periodontal adheridas a raíces preparadas con CAP y que expresan esta proteína; tienen la capacidad de producir ALP y formar tejido mineralizado. Esto indica que la proteína tiene un efecto diferenciador respecto a la migración y la adhesión de células derivadas del periodonto, favoreciendo la expresión de ALP, BSP y OPN, las cuales promueven la formación de nódulos de mineralización y el reclutamiento de células del ligamento periodontal que pueden diferenciarse en cementoblastos sobre la superficie radicular<sup>18-21</sup>.

Por otro lado, recientemente se ha logrado aislar el gen que codifica para la proteína de adhesión del cemento (Número de acceso a la base de datos GenBank: AY455942). El gen de la CAP contiene un ADN complementario de ~1435pb conteniendo un marco de lectura abierto de ~423pb; que codifica para



una proteína de 140 aminoácidos. Este gen se encuentra presente en el cromosoma 10 del genoma de *Homo sapiens* en el locus 10p13 (NT-077569.2, Hs10\_77618).

La caracterización teórica de la proteína de 140 aminoácidos ha dado como resultado una identidad del 98% con la proteína tipo tirosina fosfatasa que en su sitio catalítico tiene una prolina en vez de arginina (PTPLA) en el humano (Número de acceso NM 014241.2 en el GenBank), lo cual nos habla de que pudiera ser un splicing alternativo. Sin embargo, aún no se han realizado estudios para localizar la expresión de la CAP en el periodonto, lo cual daría indicios del papel que podría jugar en la formación y regeneración periodontal, con énfasis en el cemento radicular.

## **PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.**

El cemento radicular es un tejido mineralizado con características físico-químicas y estructurales bien conocidas que han sido descritas a detalle a nivel morfológico desde 1835. Aunque se han realizado progresos acerca del aislamiento y propagación de líneas celulares que expresan el fenotipo del cemento radicular, el conocimiento específico acerca del origen del linaje cementoblástico, y los mecanismos celulares y moleculares que controlan el proceso de la cementogénesis, aún es muy limitado a la fecha. Una de las principales causas ha sido la falta de marcadores moleculares específicos para el fenotipo cementoblástico. Por ello, el aislamiento y caracterización de moléculas que sirvan de marcadores moleculares para el fenotipo cementoblástico abre la oportunidad de determinar la localización de las células progenitoras y/o entender la biología del cemento radicular. Una molécula que se ha propuesto en la literatura como un marcador apropiado para diferenciar el cemento radicular del hueso es la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP). Sin embargo, a la fecha se desconoce la localización específica de la expresión del gen que codifica para la CAP y con ello no ha sido posible dilucidar si puede estar involucrada en la formación y regeneración de tejidos periodontales. Por lo que proponemos responder en esta tesis:

¿Cuál es la localización específica de la expresión del gen que codifica para la proteína de adhesión del cemento radicular en cortes histológicos dentales de humano?

Al responder esta pregunta con nuestra investigación obtendremos resultados que ayuden a dilucidar el posible papel de la CAP en la biología del cemento radicular.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo General:**

- Determinar espacial y temporalmente la expresión del gen de la CAP en cortes histológicos de órganos dentarios de humano.

### **Objetivos Específicos:**

- Diseñar las sondas de ARN complementario sentido y antisentido de la CAP marcadas con digoxigenina.
- Analizar la localización del ARN mensajero de la CAP en cortes histológicos de órganos dentarios humanos por medio de hibridaciones *in situ*.
- Localizar las células positivas a las sondas de RNA marcadas en los cortes histológicos de órganos dentarios de humano.

## **HIPÓTESIS.**

El ARN mensajero del gen de la CAP tendrá una expresión espacial y temporal en células del linaje cementoblástico.

## **METODOLOGÍA.**

Los cortes histológicos evaluados se encontraban localizados en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, UNAM.

Para la localización de la CAP los cortes histológicos se sometieron a la técnica de hibridación *in situ*, la cual permitió detectar la expresión específica y localizar el ARN mensajero que codifica para la CAP.

### **Diseño de sondas de ARN complementario.**

El plásmido que contenía el gen que codifica para la CAP (pDrive+CAP) fue donado al laboratorio de Biología Celular y Molecular de la UNAM por el doctor Narayanan, de la Universidad de Washington. El plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *Hind III* y *BamH I* a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se aisló el plásmido digerido y se llevó a cabo la transcripción *in vitro* para generar las sondas de ARN complementario en sentido y antisentido. Para obtener la sonda no complementaria (sentido) se pusieron 2 µg de plásmido linearizado con la enzima *Hind III* y 2 unidades/µL de la enzima polimerasa T7. Para obtener la sonda complementaria (antisentido) se pusieron 2 µg de plásmido linearizado con la enzima *BamH I* y 2 unidades/µL de la enzima polimerasa SP6. En ambas reacciones se agregaron los nucleótidos marcados con digoxigenina a una concentración final de 1X. El tiempo de incubación de la transcripción de las sondas fue de 24 horas a una temperatura de 37°C. Al término de la incubación se precipitaron con cloruro de litio 4M y se almacenaron a -80°C hasta su utilización en la hibridación *in situ*.

### **Hibridación *in situ*.**

Los cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  se sometieron a xileno por 5 minutos para quitar la parafina, se hidrataron en concentraciones de etanol al 100, 95, 75, 50, 35 y 25% por 2 minutos. Posteriormente, para hibridizar las sondas con el gen de la CAP los cortes se incubaron a 65°C durante toda la noche con la sonda de ARN complementario del gen de la CAP (experimental) y la sonda no complementaria (control) en una solución amortiguadora de fosfatos con formamida. Se lavaron al día siguiente con una solución concentrada de citratos de sodio por 30 minutos (2XSCC, 1XSCC y 0.1XSCC) a una temperatura de 55°C para quitar la sonda inespecífica de la CAP. Posteriormente se incubaron en una solución con albúmina de suero bovino al 10% con el anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) para detectar por medio de un microscopio de fluorescencia la localización específica del gen.

Las hibridaciones fueron realizadas en cinco cortes dentales para la sonda control y cinco cortes dentales para la sonda experimental.

Las fotodocumentaciones son representativas de analizar cinco campos por microscopía de fluorescencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La hibridación *in situ* en secciones de tejido periodontal humano, revela que la expresión del gen que codifica para la CAP fue localizada en la fase acelular y celular del cemento radicular (Figuras 1-4). Por otro lado, los datos obtenidos con la sonda antisentido de ARN complementario, son señales positivas ya que cuando se comparan con las secciones control como se puede observar en las figuras 1, 2, 3 y 4; muestran que no existe una señal de tinción como en las secciones donde el ARN complementario hibridizó con el ARN mensajero del gen que codifica para la CAP formando híbridos ARN-ARN de doble cadena. En las secciones donde se utilizó la sonda de ARN complementario en dirección sentido no se forman híbridos ARN-ARN por lo cual las imágenes se puede visualizar como un fondo de color oscuro. En las imágenes control se usaron cortes secuenciales para obtener imágenes de la misma zona donde la señal positiva fue observada, para que fuera representativa la comparación con los cortes de órganos dentarios de humano donde el periodonto se encontraba en buenas condiciones para realizar este estudio.

La descripción de los resultados experimentales de cada figura revela que la señal positiva se encuentra tiñendo pocas células del ligamento periodontal localizadas cerca de los vasos sanguíneos en la región celular del cemento radicular (Figura 1A, 1C y 2A). Sin embargo la importancia de este estudio radica en que los cementoblastos que se encuentran sobre el tejido mineral radicular fueron positivos (Figura 3 y 4). Lo que indica que la sonda diseñada en dirección antisentido es complementaria al ARN mensajero codificado por el gen de la CAP y forma híbridos de ARN-ARN específicos de la proteína CAP; marcador que se había propuesto como específico para diferenciar hueso alveolar de cemento radicular. Como se observa en las figuras 3 y 4, los cementoblastos se tiñen de verde y también los cementoblastos que se encuentran en la fase cementoide o matriz extracelular mineralizada del cemento radicular.

Por otro lado, los híbridos de ARN-ARN específicos para la CAP reconocen positivamente a las células localizadas en los espacios endosteales de hueso alveolar (Figura 1A y 1B); y a las células localizadas entre los espacios para vasculares lo que habla que reconoce las subpoblaciones celulares del ligamento periodontal (Figura 2A y 2B).

Tomando en conjunto los resultados de esta tesis podemos discutir que el gen que codifica para la CAP tiñe positivamente la fase cementoide del cemento humano así como pocas células localizadas en los espacios endosteales de hueso alveolar, similar a los resultados reportados por las localizaciones en tejidos de órganos dentarios de humano utilizando el anticuerpo anti-CAP (Arzate *et al* 1992). El presente estudio demuestra también que el gen que codifica para la CAP está distribuido a través de la superficie radicular del órgano dentario, en la cual incluye el cemento acelular, cemento celular y subpoblaciones del ligamento periodontal. En ciertas áreas la señal positiva reconoció células localizadas entre los vasos sanguíneos las cuales pueden representar células progenitoras del linaje cementoblástico. Además la señal de la CAP se localizó también en los espacios endosteales de hueso alveolar, esto contribuye a la propuesta de diversos reportes que han demostrado que células de los espacios endosteales de hueso alveolar migran a través de los canales vasculares hacia el ligamento periodontal y contribuyen a incrementar las células progenitoras en los espacios paravasculares del ligamento.

Los datos obtenidos de las hibridaciones en esta tesis ayudan a fundamentar diversas investigaciones que han intentado explicar el origen de los cementoblastos las cuales recaen en varias teorías. Una de las teorías sugiere que durante el desarrollo; las células ectomesenquimatosas, las células del folículo y las células de la papilla dental, cuando son estimuladas correctamente tienen la capacidad de actuar como cementoblastos.<sup>22-25</sup>. Otra teoría establece que en el estadio adulto, las células de los espacios endosteales del hueso alveolar migran y adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal exhibiendo algunas características de células madre convirtiéndose posteriormente en células formadoras de tejido mineral con un fenotipo osteo-

cementoblástico.<sup>26-31</sup> Por último, otra teoría sugiere que durante el desarrollo de la raíz, diferentes factores relacionados con las amelogéninas tales como tuftelina y ameloblastina suministradas por las células de la vaina epitelial radicular de Hertwig (HERS), pueden en parte influenciar la diferenciación de las células del folículo dentario hacia cementoblastos, de tal modo que durante el inicio del proceso de la cementogénesis, secretan la matriz pre-mineralizada del cemento<sup>32,33</sup>; o bien, se propone que son las mismas células epiteliales de Hertwig las cuales se encuentran bajo una transformación ectomesenquimatosa hacia un linaje cementoblástico que involucra la expresión de tonofilamentos y desmosomas (característica típica de los cementoblastos), apoyando el concepto de la herencia ancestral epitelial de las células cementoblásticas<sup>34-36</sup>.

De todas estas teorías es claro que se desconocen los factores que disparan la proliferación, migración y diferenciación celular de las células responsables de la formación del cemento radicular permaneciendo controversiales y como preguntas abiertas. Por ello, el que la secuencia de ARN complementario diseñada *in vitro* reconociera células que probablemente sean progenitoras de los linajes cementoblásticos y periodontales, abre la posibilidad de en un futuro poder llevar al aislamiento específico de estas líneas celulares y poder contribuir al entendimiento de la biología del cemento radicular.



## **CONCLUSIÓN.**

Con este trabajo se confirma la presencia del ARN mensajero de la CAP en el periodonto de órganos dentarios de humano.

El ARN mensajero se localiza espacialmente en subpoblaciones de células del ligamento periodontal y en células del cemento radicular.

El ARN mensajero de la CAP reconoce posibles células progenitoras del linaje periodontal ayudando al concepto de que las células que dan origen al cemento son de localización paravascular.

Con este trabajo se muestra que las sondas de ARN complementario diseñadas a partir del gen que codifica para la CAP puede ser de gran utilidad para identificar poblaciones celulares que puedan ser progenitoras del linaje cementoblástico. Ayudando a elucidar en un futuro la biología celular del cemento radicular en cuanto a su proceso de cementogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1 Paynter KJ, Pudy G (1958). A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec* 131:233-251.
- 2 Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Alvarez-Fregoso O, Wusterhaus-Chavez A, Reyes-Gasga J, Ximenez-Fyvie LA (2000). Electron microscopy, micro-analysis and Xray diffraction characterization of mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells. *J Dent Res* 79: 28-34.
- 3 Boyde A, Hobdell MH (1969). Scanning electron microscopy of lammellar bone. *Zelforsch Mikrosk Anat* 93: 213-231.
- 4 MacNeil RL, D'Errico J, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ (1998). Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? *Eur J Oral Sci* 106(1): 350-356.
- 5 Cool SM, Forwood MR, Campbell P, Bennett MB (2002). Comparisons between bone and cementum composition and the possible basis for their layered appearances. *Bone* 30: 386-392.
- 6 Bianco P (1992). Structure and mineralization of bone, in Bonucci E. (Ed), *Calcification in biological systems*, pp. 244-268, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 7 Bosshardt DD, Zalzal S, Mckee MD, Nanci A (1998). Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 250: 13-33.
- 8 Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I (1997). Expresion of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodont Res* 32. 273-278.
- 9 MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman MJ (1995). Localization and expression of osteopontin in mineralized tissues of the periodontium. *Ann New York Acad Sci* 760: 166-176.
- 10 Nanci A (1999). Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 126: 256-269.

- 11** McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC (1990). Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodont Res* 25: 99-105.
- 12** Yonemura K, Narayanan AS, Miki Y, Page RC, Okada H (1992). Isolation and partial characterization of a grow factor from human cementum. *Bone Miner* 18:15-30.
- 13** Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Arzate H, Narayanan AS (1996). Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Min Res* 11:686-692.
- 14** Ogata Y, Niisato N, Moriwaki K, Yokota Y, Furuyuma S, Sugiyama H (1997). Cementum, root dentin and bone extracts stimulate chemotactic behavior in cells from periodontal tissue. *Comp Biochem Physiol* 116: 359-365.
- 15** Pitaru S, Savion N, Hkemat M (1993). Molecular and cellular interaction of a cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodont Res* 28;560-562.
- 16** Liu HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan S, Pitaru A (1997). A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue- forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res* 12:1691-1699.
- 17** Pitaru S, Narayanan AS, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z (1995). Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodont Res* 30:360-368.
- 18** Barkana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S (2000). Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces *in vitro*. *J Dent Res* 79:1482-8.
- 19** Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan S (2001). Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29:242-248.
- 20** Saito M, Narayanan S (1999). Signaling reactions induced in human fibroblast during adhesion to cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res* 14: 65-72.

- 21** Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho IL (1995). Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *J Periodont Res* 30:52-59.
- 22** Amar S (1996). Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration. *Anat Rec* 245:361-373.
- 23** Lin WL, McCulloch CAG, Cho MI (1994). Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec* 240:492-506.
- 24** Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG (2006). Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev* 15(4):595-608.
- 25** Kemoun P, Laurencin-Dalricieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) *in vitro*. *Cell Tissue Res* 329(2):283-94.
- 26** Melcher AH (1985). Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 67: 130-131.
- 27** Melcher AH, McCulloch CAG, Cheong T, Nemeth E, Shiga A (1987). Cells from bone synthesize cementum-like and bone-like tissue *in vitro* and migrate into periodontal ligament *in vivo*. *J Periodont Res* 22: 246-247.
- 28** Giniger MS, Norton I, Sousa S, Lorenzo JA, Bronner E (1991). A human periodontal ligament fibroblasts clone releases a bone resorption inhibition factor *in vitro*. *J Dent Res* 70:99-101.
- 29** Somerman MJ, Archer SY, Shteyer A, Foster RA (1987). Protein production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine extracts from cementum. *J Periodont Res* 22: 75-77.
- 30** McCulloch CA (1995). Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1: 271-278.

- 31** McCulloch CAG, Lekic P, McKee MD (2000). Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol 2000* 24: 56-72.
- 32** Slavkin HC, Bringas PJr, Bessem C, Santos V (1988). Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molar using serumless, chemically-defined medium. *J Periodont Res* 23:28-40.
- 33** Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P Jr (2003). Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 228(4):651-63.
- 34** Mina M, Kollar EJ (1987). The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 32:123-127.
- 35** Bosshardt DD, Nanci A (2004). Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol* 31: 184-192.
- 36** Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S (2007). Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* 86(7):594-9.

## ANEXO

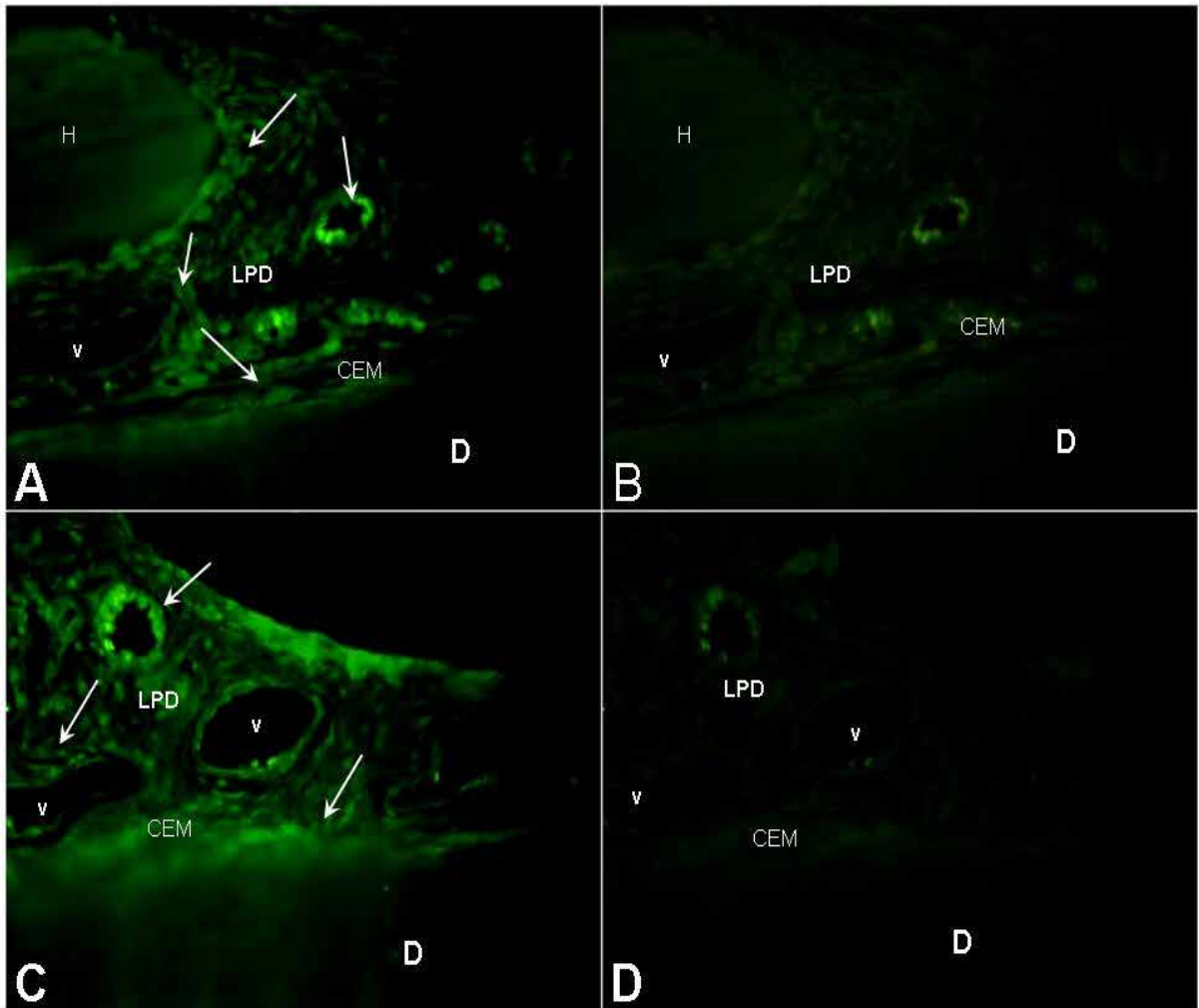


Figura 1. Hibridación *in situ* en secciones longitudinales de órganos dentarios de humano. La señal positiva del mensajero de ARN de la CAP se observa en el tejido periodontal, en la fase cementoide, en canales vasculares y en espacios endosteales de hueso alveolar señalados por las flechas (A y C). La hibridación *in situ* con la sonda sentido que sirve como control en los cortes secuenciales de la misma zona fue negativa o con señal de fondo (B y D). D = dentina, LPD = ligamento periodontal, CEM = cemento radicular, V = canal vascular.

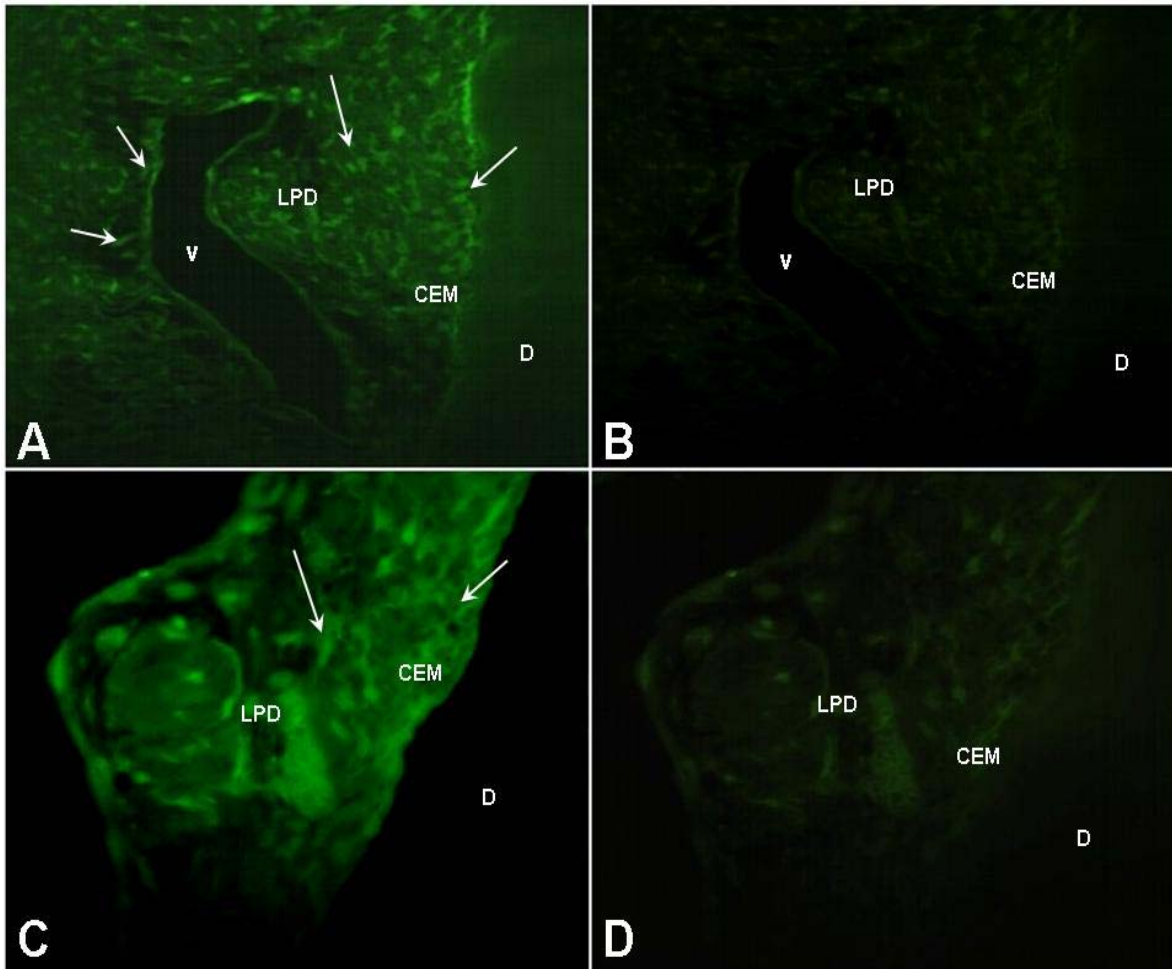


Figura 2. En ampliaciones de las secciones del órgano dentario se puede apreciar la señal positiva en las células alrededor de los canales vasculares, en el área del ligamento periodontal y cemento radicular de los híbridos ARN-ARN de la CAP, señalados por las flechas (A y C). En las imágenes (B y D) se observa la señal negativa con la sonda sentido de ARN de la CAP. D = dentina, LPD = ligamento periodontal, CEM = cemento radicular, V = canal vascular.

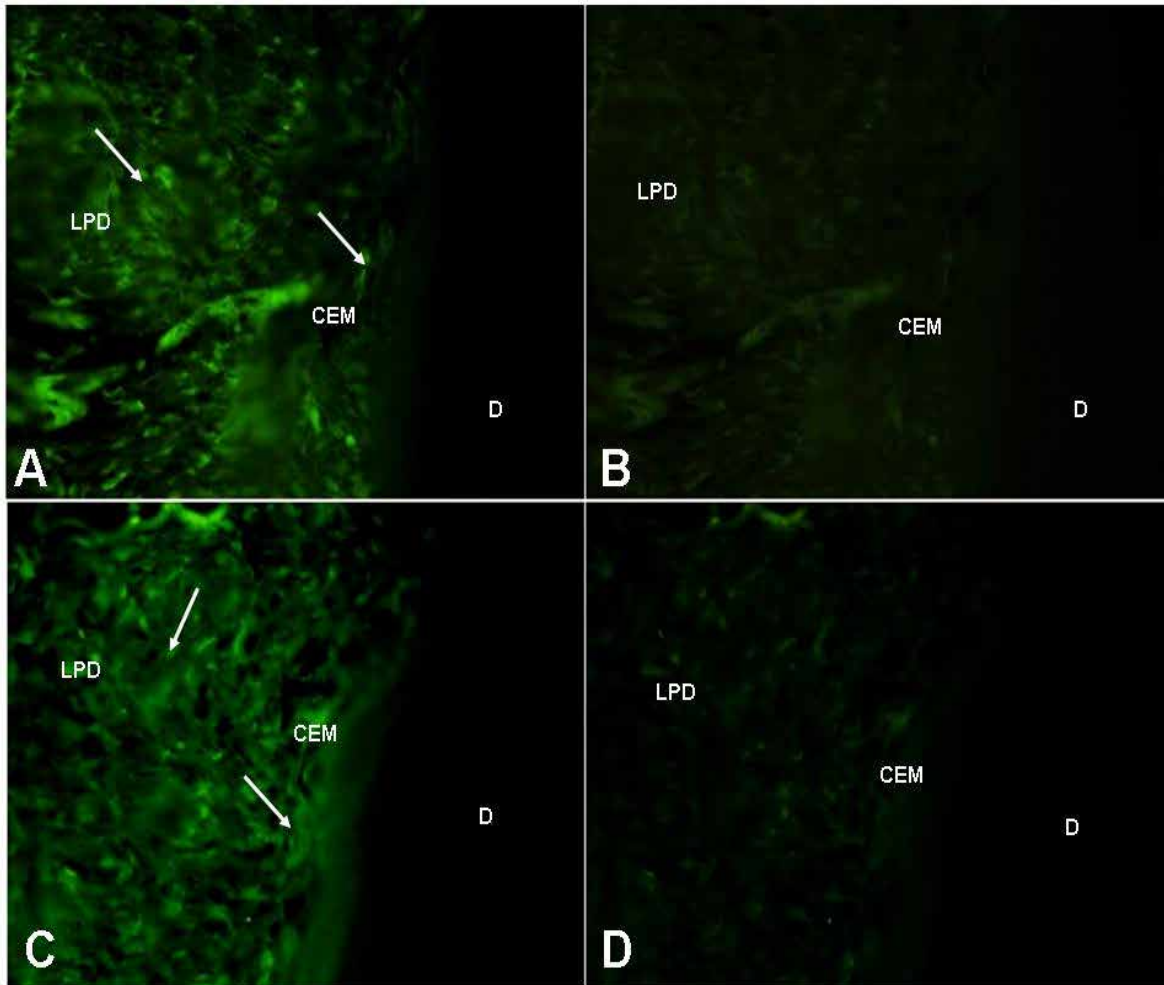


Figura 3. En ampliificaciones en el área del ligamento periodontal y cemento radicular, se observa señal positiva de los híbridos ARN-ARN de la CAP en las células del LPD y en los cementoblastos y en la fase cementoide, señalados por las flechas (A y C). En las imágenes (B y D) se observa la señal negativa con la sonda sentido de ARN de la CAP. D = dentina, LPD = ligamento periodontal, CEM = cemento radicular



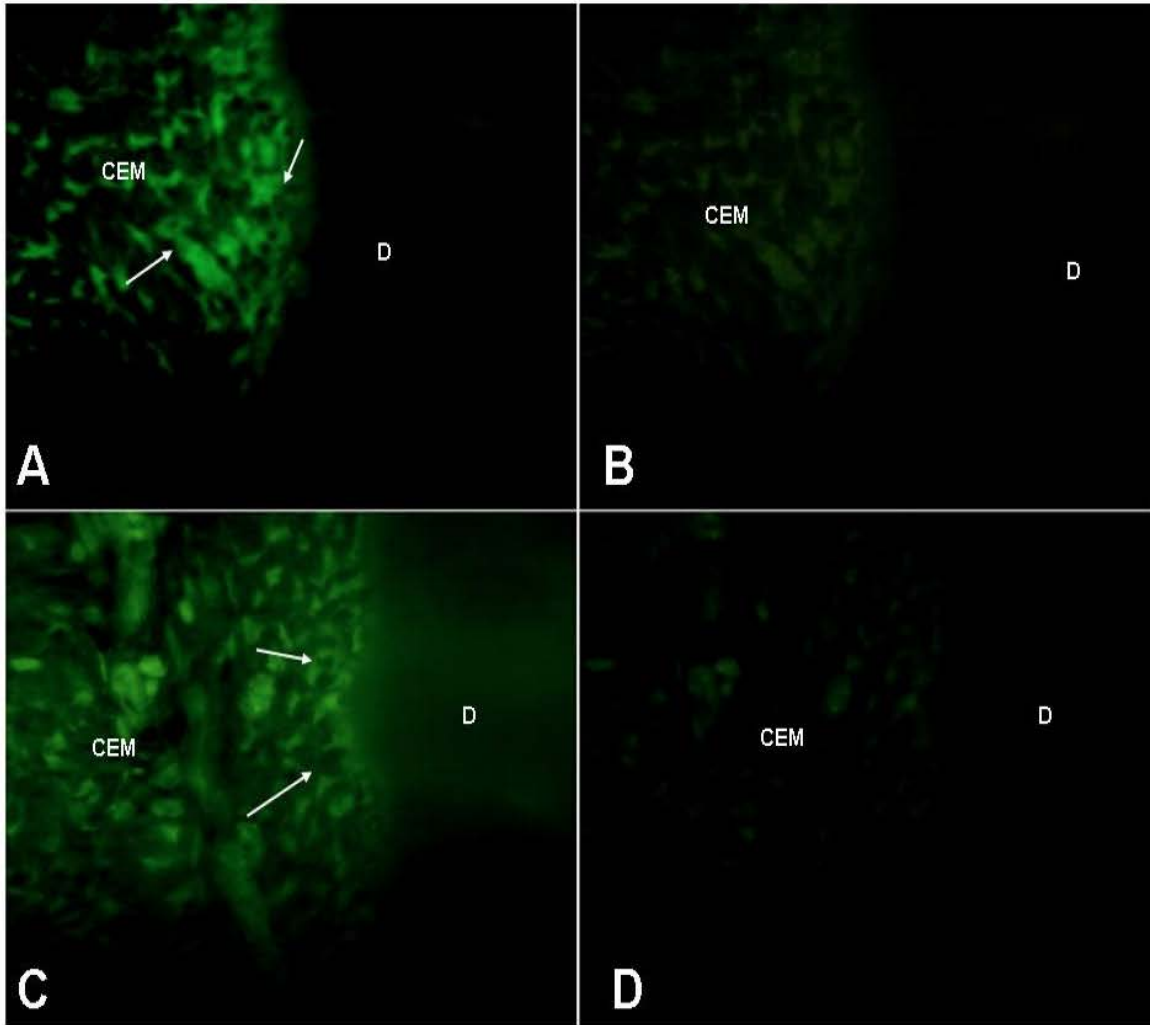


Figura 4. En ampliificaciones en el área del cemento radicular, se observa señal positiva de los híbridos ARN-ARN de la CAP en los cementoblastos y en la fase cementoide, señalados por las flechas (A y C). En las imágenes (B y D) se observa la señal negativa con la sonda sentido de ARN de la CAP. D = dentina, CEM = cemento radicular.